



**Universidad de Sevilla**  
**Facultad de Química**



# **UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA DE LA PASTA Y PAPEL**

**Esteban Daniel Babot**

**Máster en Estudios Avanzados en Química**

**2010**



**Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**





# **UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA DE LA PASTA Y PAPEL**

**Trabajo Fin de Máster**  
**Estudios Avanzados en Química**

**Directora**

**Co-director**

**Dra. Ana Gutiérrez Suárez**

Investigador Científico del CSIC  
IRNAS - CSIC

**Dr. José Carlos del Río**

Investigador Científico del CSIC  
IRNAS - CSIC

**Tutor**

**Dr. Francisco Galván Cejudo**

Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular  
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular  
Facultad de Química

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
1.1 Composición de los materiales lignocelulósicos	2
1.1.1 Celulosa	2
1.1.2 Hemicelulosa	3
1.1.3 Lignina	3
1.1.4 Compuestos extraíbles	4
1.2 Producción de pasta de papel: Calidad de las pastas	6
1.3 Enzimas en la industria de la pasta de papel	8
<b>2. OBJETIVOS</b>	11
2.1 Objetivos específicos	11
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	12
3.1 Materiales	12
3.1.1 Pasta de papel	12
3.1.2 Enzimas	12
3.1.3 Mediadores	12
3.2 Métodos	12
3.2.1 Tratamiento enzimático con lacasa de <i>P. cinnabarinus</i>	12
3.2.2 Tratamiento enzimático con lacasa de <i>M. thermophila</i>	13
3.2.3 Extracción de los compuestos extraíbles lipofílicos	13
3.2.4 Análisis de los compuestos lipofílicos mediante GC y GC/MS ...	14
3.2.5 Determinación del índice Kappa de la pasta	15
3.2.6 Determinación de la blancura ISO de la pasta	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	16
4.1 Tratamiento enzimático con lacasa de <i>P. cinnabarinus</i>	16
4.2 Tratamiento enzimático con lacasa de <i>M. thermophila</i>	22
<b>5. CONCLUSIONES</b>	28
<b>6. REFERENCIAS</b>	29

## **1. INTRODUCCIÓN**

Tradicionalmente, el uso de la biotecnología ha estado concentrado principalmente en procesos fermentativos de las industrias alimenticias y de bebidas y en el sector farmacéutico. En décadas pasadas, sin embargo, la biotecnología fue ganando terreno en procesos químicos en la fabricación de una variedad de productos industriales, incluyendo la pasta y el papel.

La pasta de papel es el producto que resulta de la separación de las fibras de la madera u otros materiales fibrosos y constituye un producto intermedio dentro del proceso global de transformación de las materias primas en papel.

La madera es el más abundante de los materiales lignocelulósicos y su estructura y composición condiciona su utilización industrial y la posible aplicación de métodos biotecnológicos. Por otro lado, la madera y otros materiales lignocelulósicos representan la mayor fuente de energía y materia orgánica renovables de la biosfera y la mayor parte de la biomasa del planeta está constituida por materiales lignocelulósicos, por lo que la degradación de estos compuestos representa el proceso biodegradativo más importante en el ciclo del carbono.

### **1.1 Composición de los materiales lignocelulósicos**

Los materiales lignocelulósicos, incluyendo los productos de origen agrícola y forestal, están constituidos por tres polímeros estructurales: celulosa, hemicelulosa, lignina y una serie de compuestos de bajo peso molecular solubles en agua (fracción hidrosoluble) o solventes orgánicos (los denominados extraíbles). También presentan pequeños contenidos en proteína y sales minerales. La proporción de estos componentes varía con la especie, entre árboles de la misma especie y en diferentes partes del propio árbol.

#### **1.1.1 Celulosa**

Es uno de los biopolímeros más abundantes en la Naturaleza, ya que se trata del principal componente estructural de las células vegetales. Comprende del 10% al 20% del peso seco de las hojas, aproximadamente el 50% del peso de la madera y la corteza de los árboles y el 90% del peso de las fibras de algodón (Streitwieser y Heathcok, 1983). Desde el punto de vista estructural, la celulosa es un polímero lineal, cuya unidad básica es la D-glucosa que se une mediante

un enlace glucosídico en la configuración  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) dando lugar a la unidad de celobiosa que se repite exactamente en la cadena polimérica. En la pared celular, las cadenas de celulosa se agregan formando microfibrillas que constituyen el elemento base de los materiales celulósicos ya que las mismas se orientan de forma diferente en cada nivel de la pared secundaria para darle resistencia (Fig. 1).

### **1.1.2 Hemicelulosas**

Son polisacáridos químicamente heterogéneos, constituidos por diferentes unidades de monosacáridos incluyendo pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos urónicos, unidos entre sí por enlaces glicosídicos, formando estructuras ramificadas y en general amorfas.

Las hemicelulosas se encuentran asociadas a la lignina y junto con ésta actúan como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular (Fig. 1), son de menor masa molecular, más accesibles, más fácilmente degradables y más fáciles de disolver que la celulosa.

### **1.1.3 Lignina**

Es un polímero aromático formado por la condensación oxidativa de precursores fenólicos, muy ramificado y amorfo. La lignina es un componente característico de la pared celular de las plantas vasculares y su función principal es actuar como material incrustante en las paredes de las fibras y como cemento en la lámina media (Fig. 1). De esta forma protege a la celulosa del ataque microbiano y confiere estructura, resistencia e impermeabilidad a los materiales lignificados.

En la figura 1 se muestra una representación esquemática de las relaciones entre los principales constituyentes de la pared celular vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina). La lignina se encuentra más concentrada en la lámina media, que es la capa externa que une las paredes celulares de las fibras contiguas en los tejidos lignificados. El resto de las capas de la pared vegetal, incluyendo la pared secundaria que es la capa más gruesa, presentan también un cierto contenido de lignina pero están principalmente constituidas por celulosa (y hemicelulosa). Tal como se observa en la figura 1, la lignina en la

pared secundaria forma una matriz amorfa que protege a los polisacáridos frente a la degradación microbiana y la hidrólisis enzimática en general.

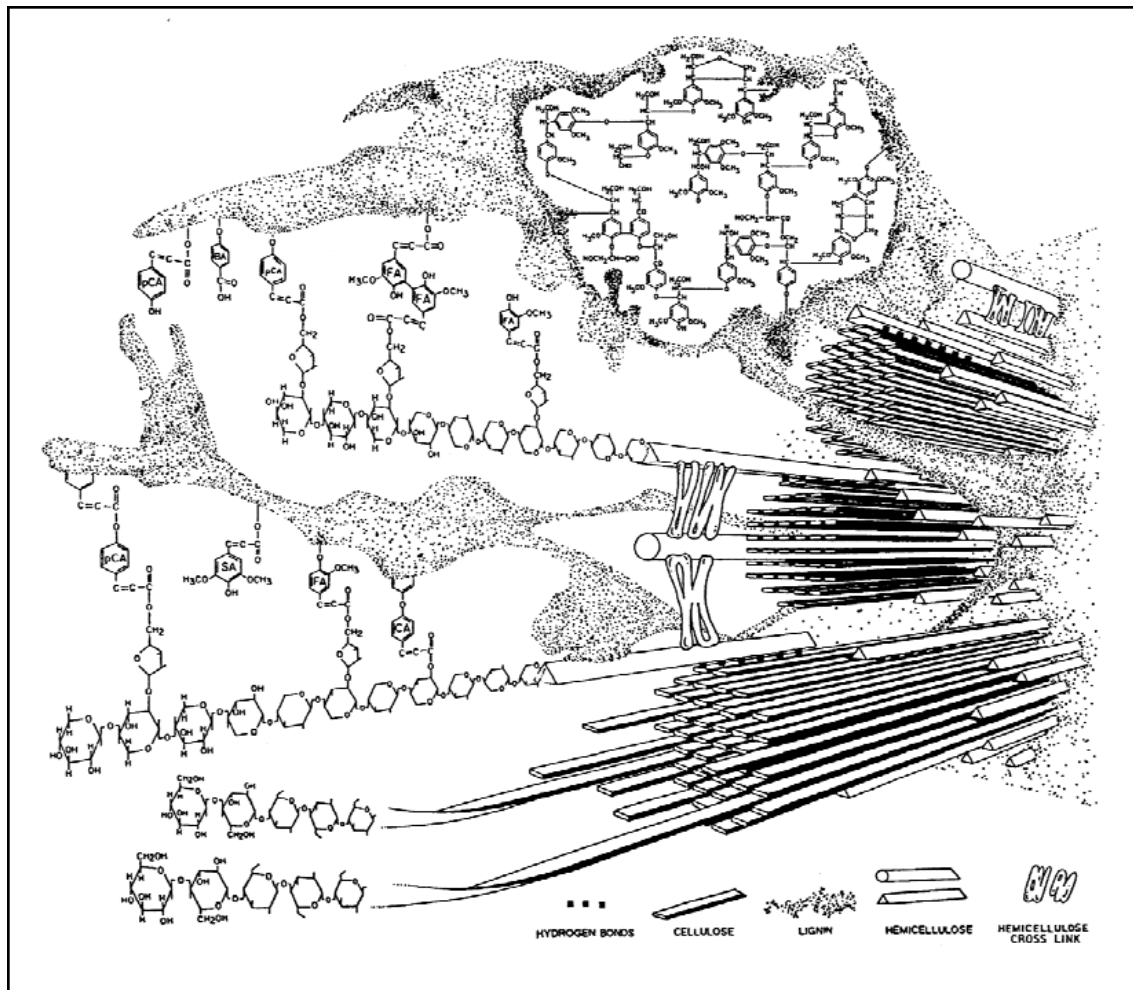


Figura 1: Representación esquemática de las relaciones entre los principales constituyentes de la pared celular vegetal (celulosa, lignina y hemicelulosa) (Bidlack et al. 1992).

#### 1.1.4 Compuestos extraíbles

Están formados por compuestos lipofílicos que incluyen alcanos, alcoholes grasos, ácidos grasos, ácidos resínicos, esteroides, otros terpenoides, esteroides conjugados (como ésteres y glicósidos), triglicéridos y ceras (Fig. 2).

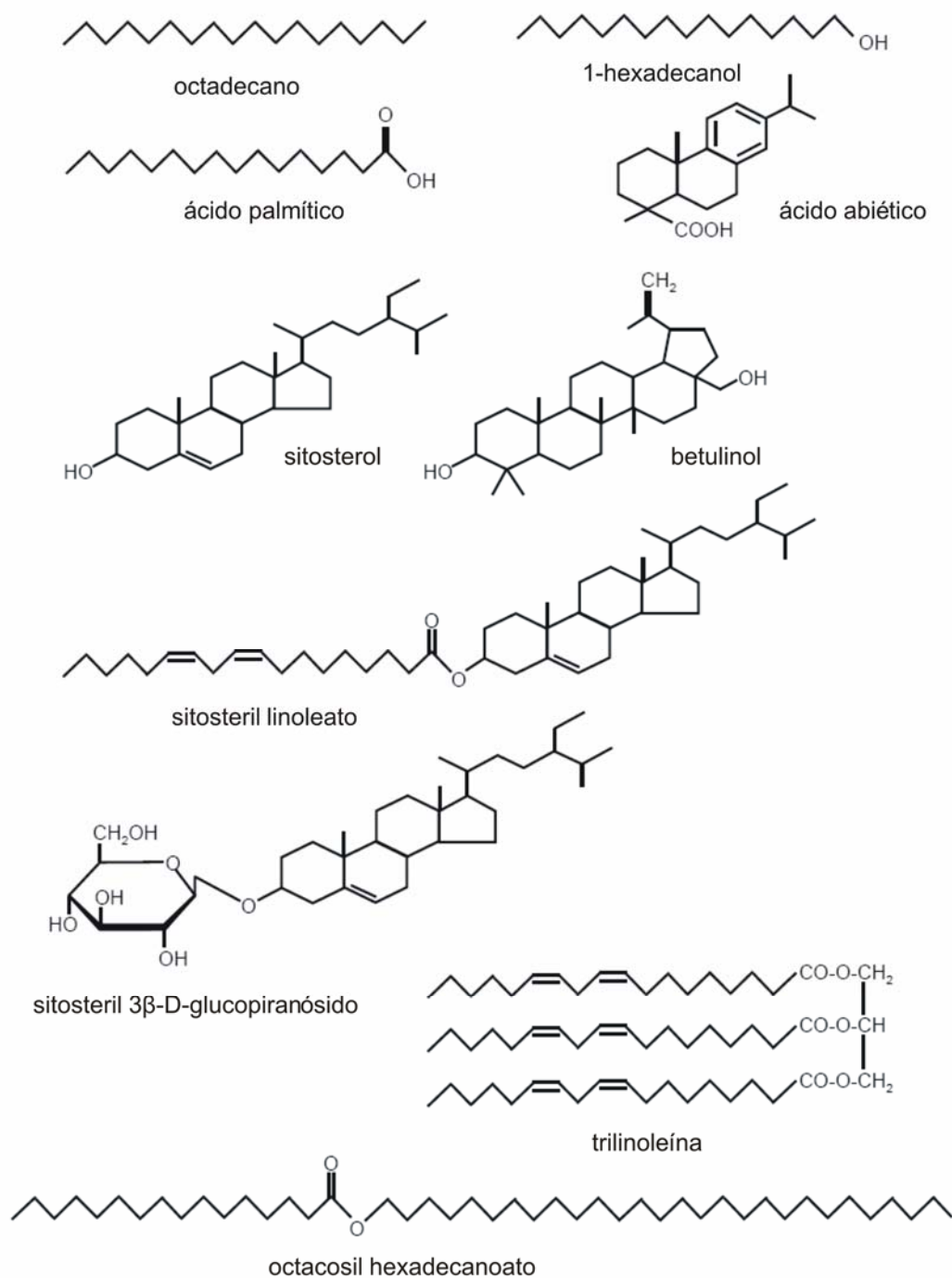


Figura 2: Estructuras químicas de algunos extraíbles lipofílicos presentes en materiales lignocelulósicos: alcanos (octadecano); alcoholes grasos (1-hexadecanol); ácidos grasos (ácido palmítico), ácidos resínicos (ácido abiético); esteroides (sitosterol); triterpenoides (betulinol); ésteres de esteroides (sitosteril linoleato); glicósidos de esteroides (sitosteril 3β-D-glucopiranosido); triglicéridos (trilinoleína) y ceras (octacosil hexadecanoato).

Una de las principales funciones de los compuestos extraíbles es la protección de la planta contra los patógenos, siendo la baja degradabilidad de muchos de estos compuestos un factor importante que contribuye a este fin. Los contenidos de sustancias extraíbles presentan variaciones con la edad, la altura del árbol, la especie y las condiciones de sitio en que se han desarrollado.

## **1.2 Producción de pasta de papel: Calidad de las pastas**

La fabricación de pastas de papel utilizando tecnologías menos contaminantes, ha traído consigo nuevos problemas en el blanqueo de las mismas que no se daban al utilizar reactivos más agresivos y contaminantes.

En el proceso de blanqueo se trata químicamente la pasta de celulosa para eliminar la lignina residual que queda después del proceso de cocción y que hace que la pasta presente un color oscuro como consecuencia de la reacción de oxidación durante la cocción.

La acción deslignificante del oxígeno se conoce desde hace tiempo pero el desarrollo del blanqueo con oxígeno ha sido bastante lento por la degradación de la celulosa y demás polisacáridos de la madera. Como consecuencia, el blanqueo con oxígeno viene acompañado a menudo por pérdidas de rendimiento y viscosidad de la pasta. Las ventajas del peróxido se apoyan en su facilidad de aplicación, su versatilidad y la naturaleza relativamente inocua de los productos de la reacción. Uno de los problemas que ha surgido con la introducción de estos reactivos está relacionado con la blancura de las pastas, porque de momento ni el oxígeno ni la combinación de oxígeno y peróxido pueden igualar la eficacia de la cloración para la eliminación de los productos derivados de la lignina, responsable del color de la pasta.

Los extraíbles lipofílicos de la madera, a menudo referidos como resinas de la madera (Fig. 3A), causan los llamados depósitos de pitch durante la producción de pasta y papel (Fig. 3B) (Hillis y Sumimoto, 1989; Back y Allen, 2000).

La formación de depósitos de pitch es un gran problema en la industria papelera siendo éste el responsable de la disminución de los niveles de producción, los altos costes de mantenimientos de los equipos, los altos costes de operación y una incidencia incrementada de los defectos en el producto final con reducción de la calidad y los beneficios (Back, 2000). Asimismo, los



efluentes del proceso contienen extraíbles de la madera que pueden ser tóxicos y contaminar el medioambiente (Leach y Thakore, 1976; Liss et al. 1997).

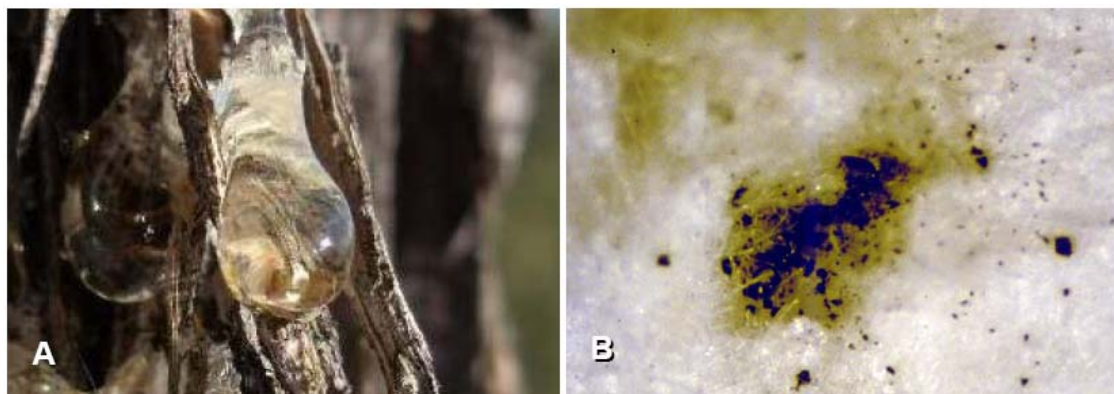


Figura 3: Exudado resínico (A). Depósitos de “pitch” en una pasta de papel (B) (tomado de Gutiérrez et al. 2010)

La naturaleza e importancia de los problemas de pitch no sólo dependen de la madera utilizada, sino también de los procesos industriales de pasteado y blanqueo aplicado.

Tradicionalmente, los depósitos de pitch en las industrias de pasta de papel, se han reducido por almacenamiento al aire libre de los troncos o de las astillas. Se sabe que este tipo de almacenamiento reduce el contenido en resinas de la madera y permite cambios en el estado de las mismas. Durante el almacenamiento, algunos extractos se pierden por procesos oxidativos e hidrolíticos debido a la acción de enzimas presentes en las plantas así como también por microorganismos colonizadores. El almacenamiento de la madera en astillas, reduce más rápido el contenido en resinas debido a que las transformaciones químicas y biológicas ocurren a mayor velocidad al aumentar la superficie de contacto (Hillis y Sumimoto, 1989). Por este motivo, el almacenamiento de la madera puede reducir los problemas de pitch considerablemente, pero depende de las condiciones en las que se realice. Por otro lado, los almacenamientos prolongados de la madera pueden producir una disminución en el rendimiento de la pasta de papel por la acción de hongos que degradan la celulosa.

### **1.3 Enzimas en la industria de la pasta de papel**

El uso de enzimas en las industrias de pasta y papel ha aumentado rápidamente desde mediados de los años ochenta. Aunque muchas de estas aplicaciones están aún en estado de investigación y desarrollo, otras han comenzado ya a aplicarse en la industria.

Las lacasas (EC 1.10.3.2), constituyen un grupo de enzimas oxidativas cuyo interés ha ido creciendo significativamente en los recientes años (Mayer y Staples, 2002; Riva, 2006; Rodríguez Couto y Tocco Herrera, 2006; Widsten y Kandelbauer, 2008; Gutiérrez et al. 2009). Las lacasas, son metaloenzimas que presentan una gran multifuncionalidad ya que contienen en su estructura molecular cuatro átomos de cobre (Fig. 4) (Gutiérrez et al. 2010). Además, este grupo de enzimas es de gran interés para el desarrollo de las tecnologías respetuosas con el medioambiente (Mayer y Staples. 2002).

Por otro lado, el uso de lacasas en presencia de un mediador redox, aumenta en gran medida su potencial en la degradación de la lignina y otros compuestos aromáticos. Existen numerosos trabajos sobre el uso del sistema lacasa-mediador para la deslignificación y el blanqueo de diferentes pastas de papel (Call y Mücke, 1997; Paice et al. 1995; Sigoillot et al. 2005).

Debido al potencial redox de los cofactores cúpricos, la acción directa de las lacasas es en principio limitada a estructuras fenólicas que representan sólo un pequeño porcentaje en lignina. Sin embargo, el interés sobre las lacasas como biocatalizadores industriales se ha incrementado fuertemente al descubrir el efecto favorable de algunos compuestos sintéticos como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (Call, 1994), lo cual ha expandido su acción a sustratos no fenólicos incrementando su potencial en la degradación de lignina y por lo tanto su potencial en el blanqueo de la pasta (Camarero et al. 2004; Ibarra et al. 2007; Gutiérrez et al. 2009)

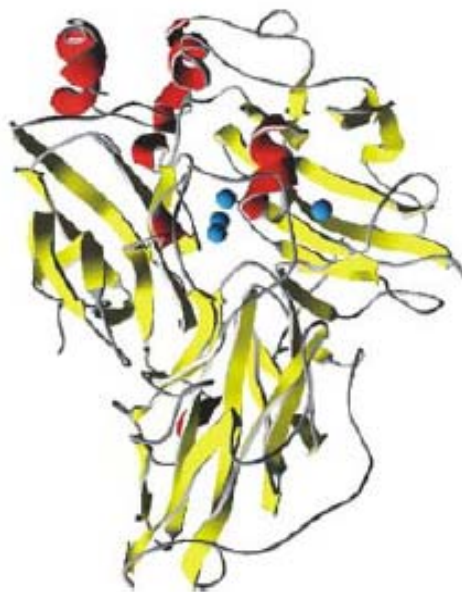


Figura 4: Esquema de la estructura molecular de una lacasa de alto potencial rédox, proveniente del hongo basidiomiceto *Trametes versicolor*.

Muy recientemente, se ha publicado por primera vez la elevada eficacia del sistema lacasa-mediador para la eliminación de extraíbles lipofílicos presentes en pastas de diferentes orígenes, procesos de pasteado, material de partida o de la naturaleza química del compuesto a ser degradado (Gutiérrez et al. 2006a). En estos estudios, la lacasa del basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de HBT fue muy eficaz en eliminar esteroides libres y conjugados (95-100% de degradación) de la pasta de *Eucalyptus globulus* proveniente de un proceso Kraft (Fig. 5) (Gutiérrez et al. 2009).

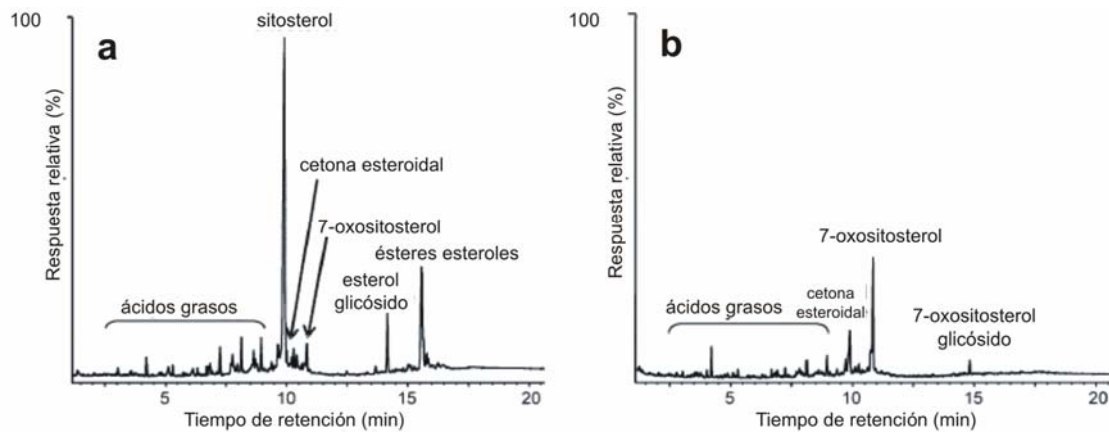


Figura 5: Análisis por cromatografía de gases de compuestos lipofílicos en pasta de *Eucalyptus globulus* antes (a) y después (b) del tratamiento lacasa-HBT.

Por el contrario, el uso del HBT a nivel industrial no es factible debido a que es un mediador sintético de elevado coste y posible toxicidad. Debido a este motivo, en el presente trabajo se evaluó la acción de diferentes sistemas lacasa-mediador utilizando mediadores naturales que carecen de toxicidad y además son de bajo coste, con el propósito de aumentar la blancura y disminuir la formación de los depósitos de pitch en la producción de pasta de papel.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente proyecto es buscar una solución enzimática a los problemas de depósitos de pitch generados por extractivos lipofílicos y al mismo tiempo, potenciar la deslignificación de los materiales lignocelulósicos para incrementar la blancura. Con este fin, se evaluará la acción de un sistema lacasa-mediador en pastas kraft de *Eucalyptus globulus*.

### 2.1 Objetivos específicos

- Evaluar la acción de una lacasa proveniente del hongo *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de dos mediadores naturales, el metil-3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato (metilsiringato) y el 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (siringaldehído) en la eliminación de los extraíbles lipofílicos y de la lignina de las pastas de *E. globulus*.
- Evaluar la acción de una lacasa proveniente del hongo *Myceliophthora thermophila* en presencia de los mediadores naturales, metilsiringato y siringaldehído en la eliminación de los extraíbles lipofílicos y de la lignina de las pastas de *E. globulus*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Pasta de papel**

Se utilizó pasta de *Eucalyptus globulus* sin blanquear proveniente de un proceso kraft suministrada por la fábrica ENCE de Pontevedra, España.

##### **3.1.2 Enzimas**

Se usaron dos lacasas diferentes. La primera fue suministrada por Beldem (Andenne, Bélgica), obtenida de una cepa hiperproductora del hongo *Pycnoporus cinnabarinus*. La segunda lacasa utilizada fue proporcionada por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) y se obtuvo del hongo *Myceliophthora thermophila*.

##### **3.1.3 Mediadores**

Se utilizaron como mediadores naturales el siringaldehído suministrado por Sigma-Aldrich y el metilsiringato suministrado por Alfa Aesar (VWR).

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Tratamiento enzimático con lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus***

El tratamiento de las pastas se llevó a cabo en matraces de 500 mL usando 5 g de pasta seca de *Eucalyptus globulus* con un 3% de consistencia (p/p) en tampón tartrato sódico 50 mM a pH 4. Como mediadores se utilizaron siringaldehído y metilsiringato, ambos a una concentración de 6,75mM. La dosis enzimática fue de 20 U/g de pasta seca. Los tratamientos se realizaron en un baño térmico con una agitación de 170 rpm y a una temperatura de 50°C durante 12 horas.

Después de este tratamiento, las pastas se lavaron con 1000 mL de agua destilada mediante filtración al vacío y se colocaron en bolsas de plástico termorresistentes para someterlas a una etapa de blanqueo con peróxido usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (p/p) y NaOH al 1,5% (p/p), ambos referidos al peso de la pasta seca. Esta etapa se llevó a cabo con la pasta a un 5% de consistencia, a 90°C durante 2 horas.

Las muestras fueron identificadas como:

- Control: Tampón + Pasta
- Lac. Pc: Tampón + Pasta + Lacasa *P. cinnabarinus*
- Lac. Pc - MeS: Tampón + Pasta + Lacasa *P. cinnabarinus* + Metilsiringato
- Lac. Pc - Sir: Tampón + Pasta + Lacasa *P. cinnabarinus* + Siringaldehido

### **3.2.2 Tratamiento enzimático con lacasa de *Myceliophthora thermophila***

Este tratamiento se realizó siguiendo el mismo procedimiento aplicado al de la lacasa de *P. cinnabarinus* variando únicamente el pH (6) y el tampón ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Las muestras fueron identificadas como:

- Control: Tampón + Pasta
- Lac. Mt: Tampón + Pasta + Lacasa *M. thermophila*
- Lac. Mt - MeS: Tampón + Pasta + Lacasa *M. thermophila* + Metilsiringato
- Lac. Mt - Sir: Tampón + Pasta + Lacasa *M. thermophila* + Siringaldehido

### **3.2.3 Extracción de los compuestos extraíbles lipofílicos**

Para la obtención de los compuestos extraíbles lipofílicos, las pastas se extrajeron con acetona en un extractor de tipo Soxhlet durante seis horas. Este extractor está constituido por un condensador, un tubo de extracción y un matraz, donde la extracción se lleva a cabo por contacto continuo de un solvente (acetona) con la muestra sólida (pasta) que se encuentra en el interior de un cartucho de celulosa previamente lavado con acetona para eliminar contaminantes durante la extracción. Una vez finalizada la extracción, el disolvente se evaporó en un rotavapor. La cantidad de extracto fue determinada por gravimetría. Los extractos lipofílicos se secaron en atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  y redisolvieron en cloroformo para su posterior análisis por GC y GC/MS.

### **3.2.4 Análisis de los compuestos lipofílicos mediante GC y GC/MS**

La combinación de la cromatografía de gases (GC) con la espectrometría de masas (GC/MS) resulta una técnica analítica muy útil para el análisis de mezclas de compuestos orgánicos volátiles o semi-volátiles, siendo por lo tanto útil en la identificación de cada uno de los componentes existentes en los extractos lipofílicos.

La cromatografía de gases se utiliza para separar compuestos que se encuentran en mezclas complejas y como método de identificación y determinación cuantitativa de cada uno de esos componentes. En este tipo de cromatografía la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria es líquida depositada en un soporte sólido apropiado, donde su principio de operación envuelve la volatilización de la muestra, la separación de cada componente en la columna y la detección de los diferentes componentes por el detector.

Los análisis cromatográficos de los extractos se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent (Hewlett-Packard, Hoofddorp, Netherlands) equipado con un detector de ionización de llama (FID, flame ionization detector) y una columna capilar corta de alta temperatura de sílice fundida (DB-5HT J&W; 5m x 0,25mm I.D., con 0,1  $\mu\text{m}$  de espesor de película) para análisis por GC. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 300°C y 350°C respectivamente. Se utilizó Helio como gas portador y la inyección se realizó en modo splitless. El programa de temperaturas del horno fue de 100°C (1 min) a 350°C (3 min) a 15°C/min, manteniendo la temperatura final 5 minutos.

Para la separación e identificación de los compuestos se utilizó un espectrómetro de masas Varian Star 3400 acoplado a un detector de trampa de iones (ITD, Varian Saturn 2000) usando una columna capilar de 15m x 0,25mm DB-5HT (0,1 $\mu\text{m}$ , J&W Scientific). Se utilizó Helio como gas portador y la inyección se realizó en modo splitless. Las muestras se inyectaron con un inyector automático (Varian 8200). La temperatura del inyector durante la inyección fue de 120°C y 0,1 min, después de la inyección se programó a 380°C (10 min) a una velocidad de 200°C/min. El horno se programó a 120°C durante 1 min y a 380°C durante 5 min a 10°C/min. Las temperaturas del ITD y de la línea de transferencia fueron de 200°C y 300°C respectivamente. La identidad de cada componente se determinó por comparación de sus espectros



de masas con los espectros existentes en las librerías (Wiley y NIST) y con espectros publicados anteriormente.

### **3.2.5 Determinación del índice Kappa de la pasta**

El procedimiento estándar utilizado en la industria para determinar el grado de deslignificación en una pasta, es el cálculo del índice Kappa por la norma TAPPI T 236cm-85 (volumen en mL de una disolución de  $\text{KMnO}_4$  0,1N consumido por gramo de pasta). La lignina de la pasta reacciona con el permanganato y la cuantificación del permanganato consumido se realiza por titulación con tiosulfato de sodio.

Las medidas de índices de Kappa de las pastas se realizaron en la fábrica de ENCE (Pontevedra).

### **3.2.6 Determinación de la blancura ISO de la pasta**

Esta norma especifica un método para medir el factor de reflectancia difusa en azul (grado de blancura ISO) de pasta para papel y cartones.

El alcance de esta norma está restringido a pastas para papel y cartones blancos o casi blancos. Se pueden medir los materiales que presenten una fluorescencia que fomente la aparición de blancura, pero si se desea lograr una estandarización y concordancia entre los instrumentos, el nivel de energía ultravioleta de la iluminación se debe ajustar usando un patrón de calibración de fluorescencia.

Las medidas de índices de Kappa de las pastas se realizaron en la fábrica de ENCE (Pontevedra).

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los principales compuestos lipofílicos presentes en la pasta de *E. globulus* incluyen ácidos grasos, así como esteroides libres y esterificados. Estos últimos son los principales responsables de la formación de los depósitos de pitch en pastas de *Eucalipto* (Gutiérrez et al. 2001). Con el fin de eliminar estos compuestos se han realizado tratamientos de las pastas con dos lacasas y dos mediadores naturales y los resultados se muestran a continuación.

##### **4.1 Tratamiento enzimático con lacasa de *P. cinnabarinus***

Los resultados de la eliminación de los extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* mediante el tratamiento de dicha pasta con lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de los mediadores naturales se muestran en la tabla 1.

Antes de la fase de peróxido, con el metilsiringato como mediador, los esteroides libres y los ésteres de esteroides disminuyeron en un 45% y 80% respectivamente. Usando el siringaldehído como mediador, los esteroides libres se han eliminado en un 31% y los ésteres de esteroides en un 71%. Después de la fase de peróxido, no se observa diferencia significativa en los porcentajes de degradación con respecto al tratamiento enzimático antes de aplicarle la fase de peróxido. En estudios realizados por Gutiérrez et al. (2008), demostraron que la lacasa del basidiomycete *P. cinnabarinus* en presencia de HBT fue capaz de degradar los esteroides libres en un 95-100% y un 65-100% de degradación para los ésteres. Si bien la acción de los mediadores naturales estudiados no tuvo la misma respuesta ante los esteroides libres, los ésteres de esteroides fueron degradados con la misma eficacia que los publicados por Gutiérrez et al. (2008).

En las figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas de gases de las pastas tratadas antes y después de la fase de peróxido respectivamente. En las mismas, se puede observar la degradación de los extractos lipofílicos presentes en la pasta de *E. globulus* del cromatograma control en relación a los cromatogramas de las muestras tratadas con y sin mediador.

**Tabla 1:** Porcentajes de degradación de los principales grupos de lípidos de la pasta tratada con lacasa de *P.cinnabarinus* en presencia de metilsiringato (MeS) y siringaldehído (Sir) como mediadores naturales antes y después de una fase de peróxido (P).

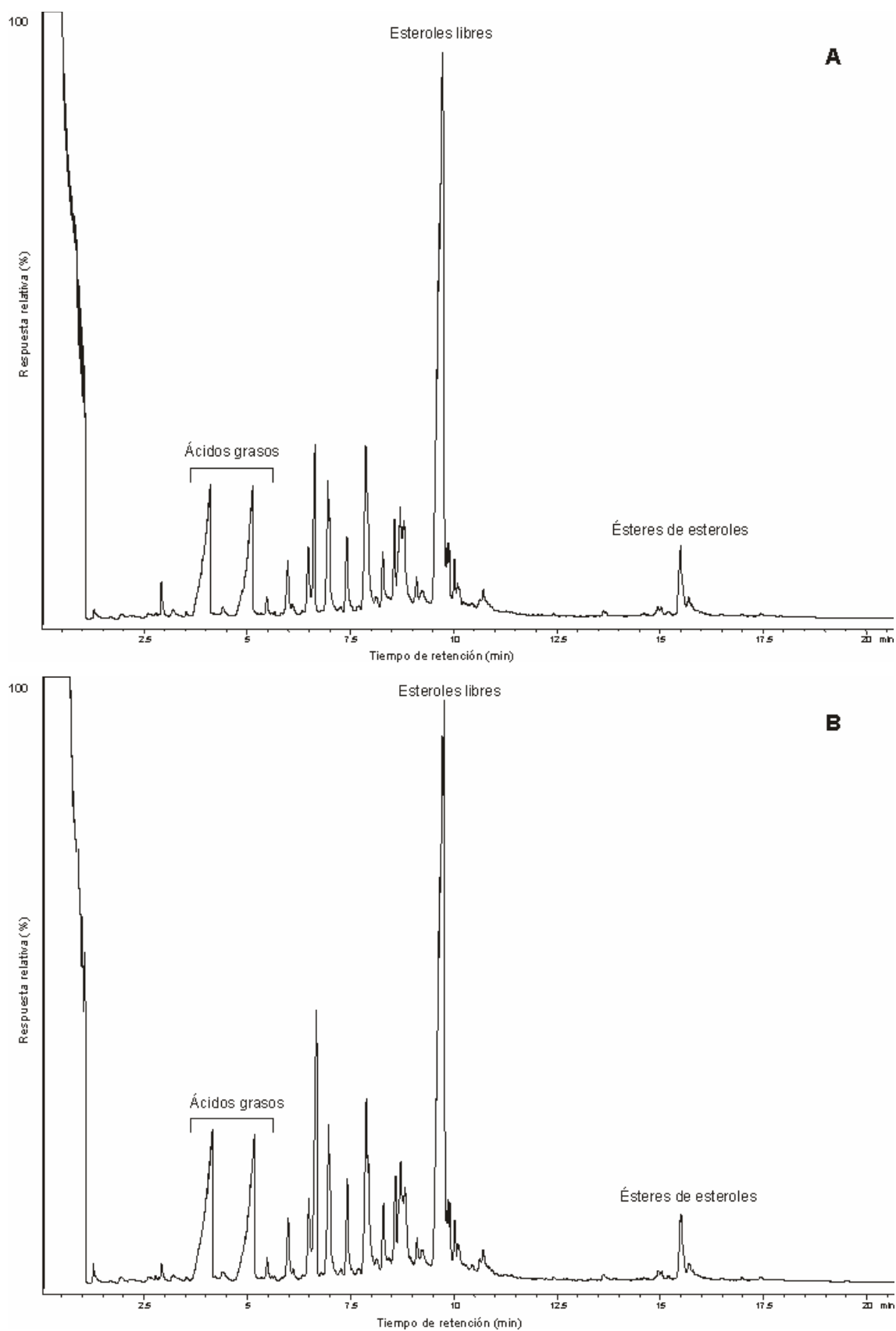
Degradación (%)			
	<i>Lac Pc</i>	<i>Lac Pc-MeS</i>	<i>Lac Pc-Sir</i>
Esteroles libres	0	45	31
Ésteres de esteroles	0	80	71
	<i>Lac Pc-P</i>	<i>Lac Pc-MeS-P</i>	<i>Lac Pc-Sir-P</i>
Esteroles libres	0	35	39
Ésteres de esteroles	0	77	79

En cuanto a los resultados obtenidos para el blanqueo y deslignificación de las pastas antes de la fase de peróxido, la enzima lacasa de *P. cinnabarinus* junto a los dos mediadores naturales ensayados, no mejoran de forma apreciable estas características (Tabla 2). Este hecho podría deberse a que el mediador se queda unido o retenido en la pasta.

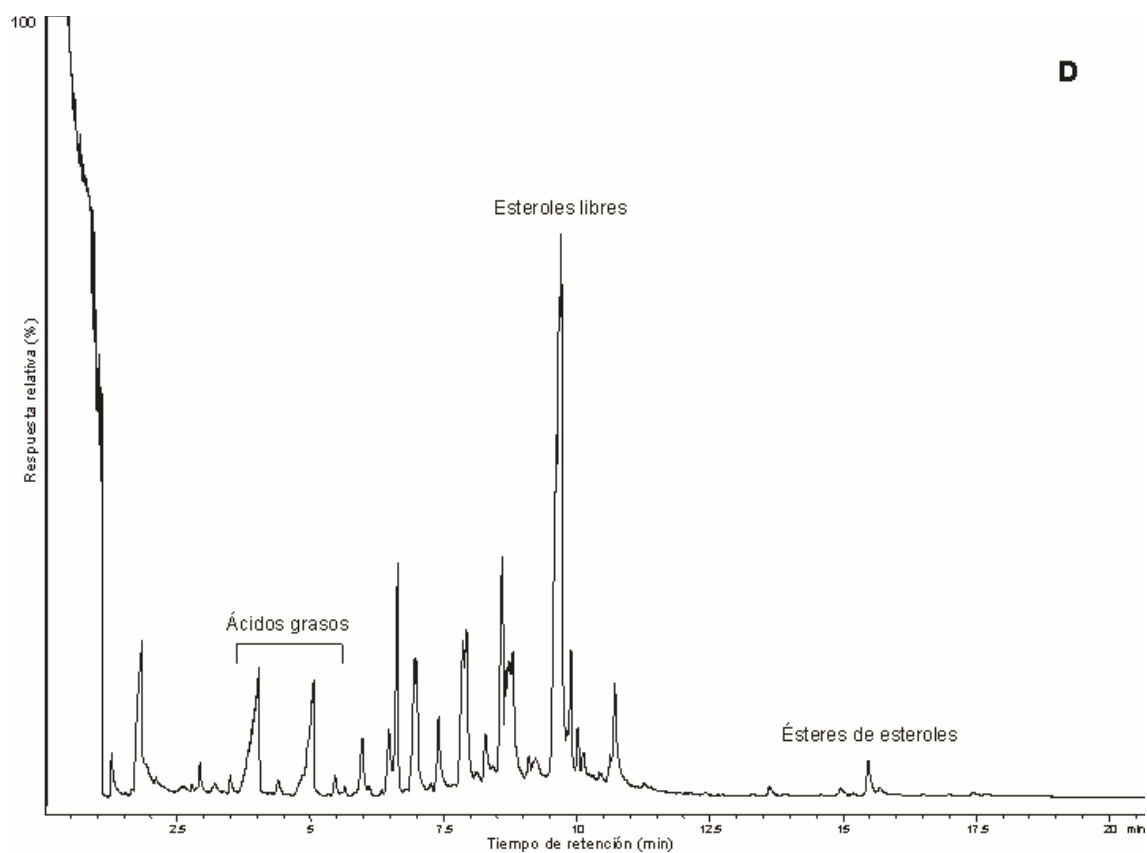
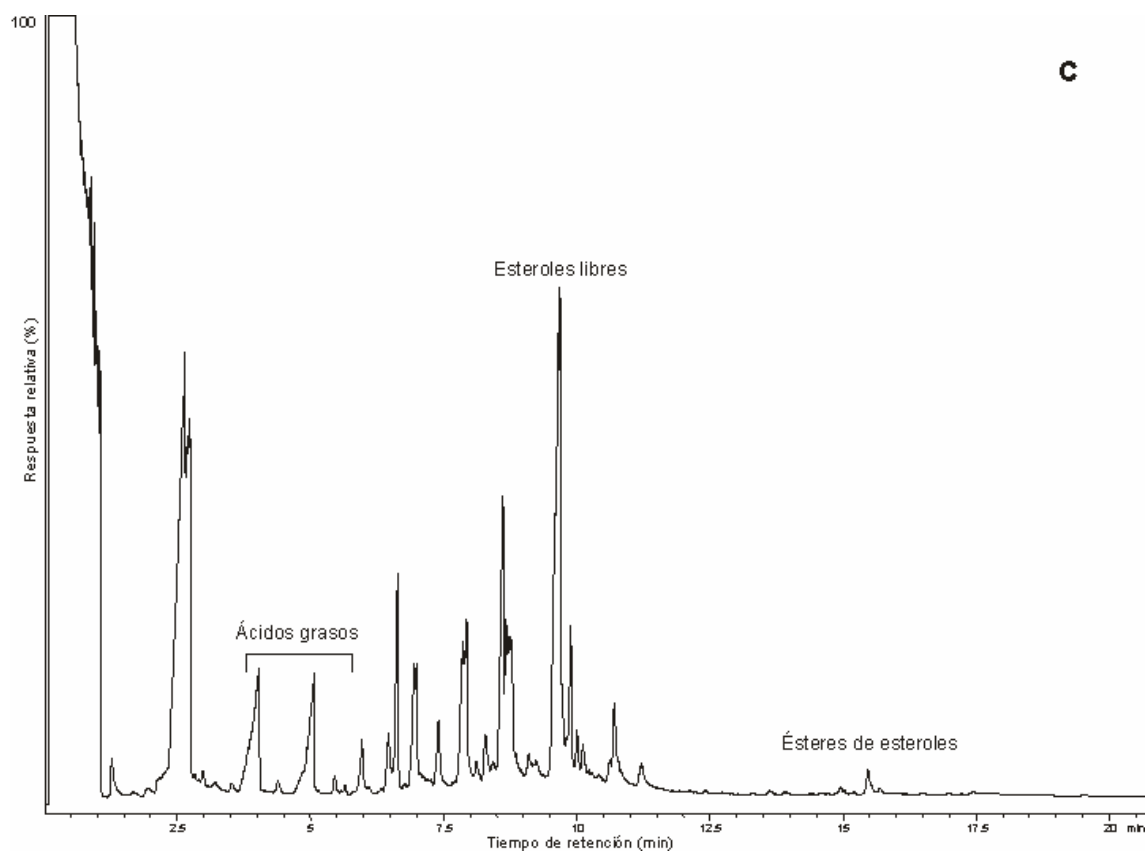
Como se observa en la tabla 2, cuando tras el tratamiento enzimático se aplica una fase de peróxido, los resultados de blancura % ISO y del índice Kappa mejoran. Estos resultados se obtienen del el tratamiento con lacasa de *P. cinnabarinus* y metilsiringato, en el que el índice Kappa disminuye 1,1 puntos y la blancura % ISO aumenta 5,1 puntos. En los tratamientos con lacasa sin mediador y lacasa con mediador siringaldehído el índice Kappa disminuye en 0,1 y 0,9 puntos respectivamente; la blancura % ISO aumenta en 0,5 y 5,0 puntos respectivamente.

**Tabla 2:** Propiedades de la pasta de *E. globulus* tras los tratamientos con lacasa de *P. cinnabarinus* (Lac Pc) en presencia de los mediadores naturales metilsiringato (MeS) y siringaldehído (Sir) antes y después de una fase con peróxido (P).

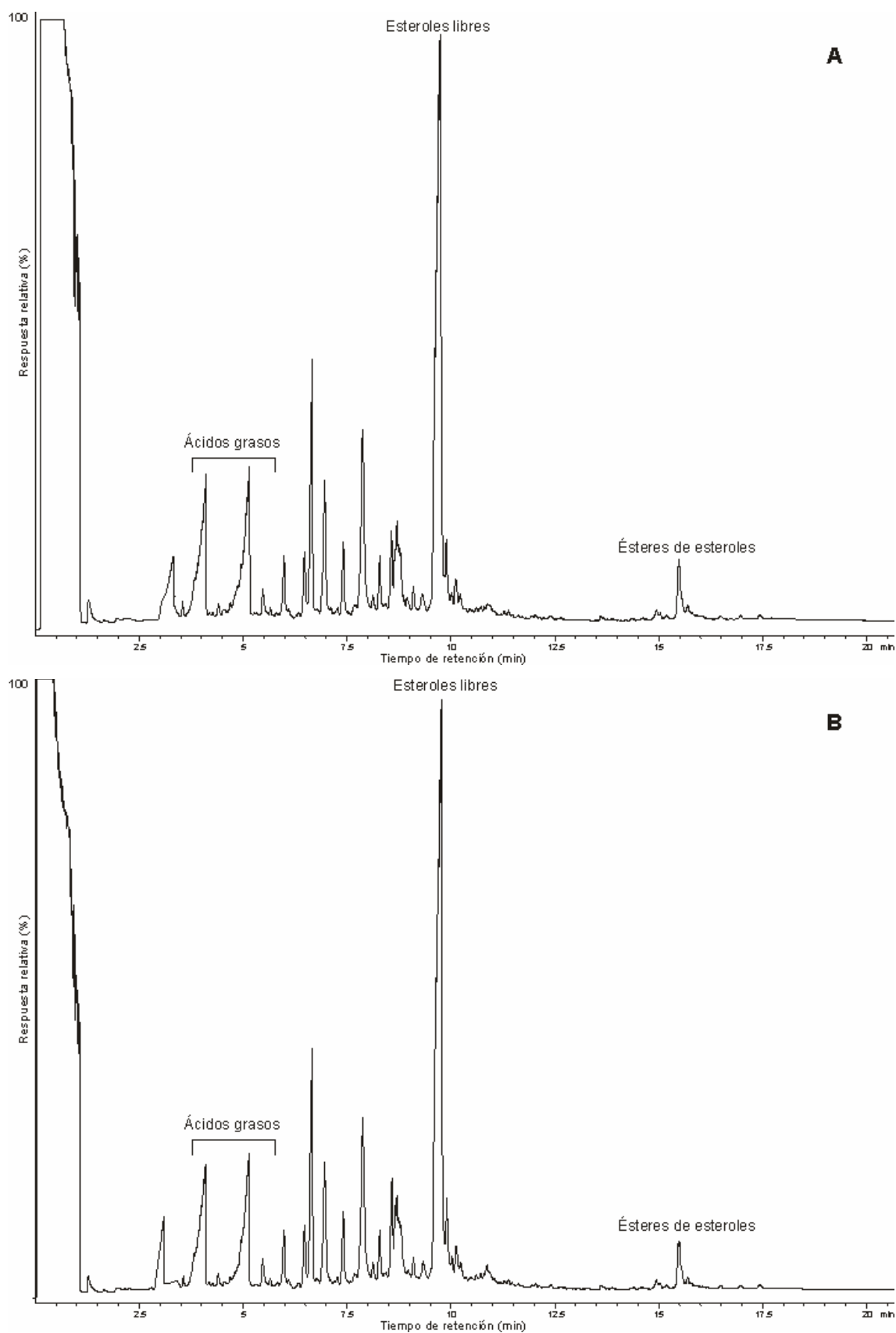
Muestras	Blanqueo con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Indice Kappa	Blancura % ISO
<b>Control</b>	----	12,0	44,7
	<b>P</b>	<b>10,5</b>	<b>57,4</b>
<b>Lac Pc</b>	----	13,6	42,3
	<b>P</b>	<b>10,4</b>	<b>57,9</b>
<b>Lac Pc - Met.</b>	----	13,3	38,4
	<b>P</b>	<b>9,4</b>	<b>62,5</b>
<b>Lac. Pc – Sir.</b>	----	14,3	37,4
	<b>P</b>	<b>9,6</b>	<b>62,4</b>



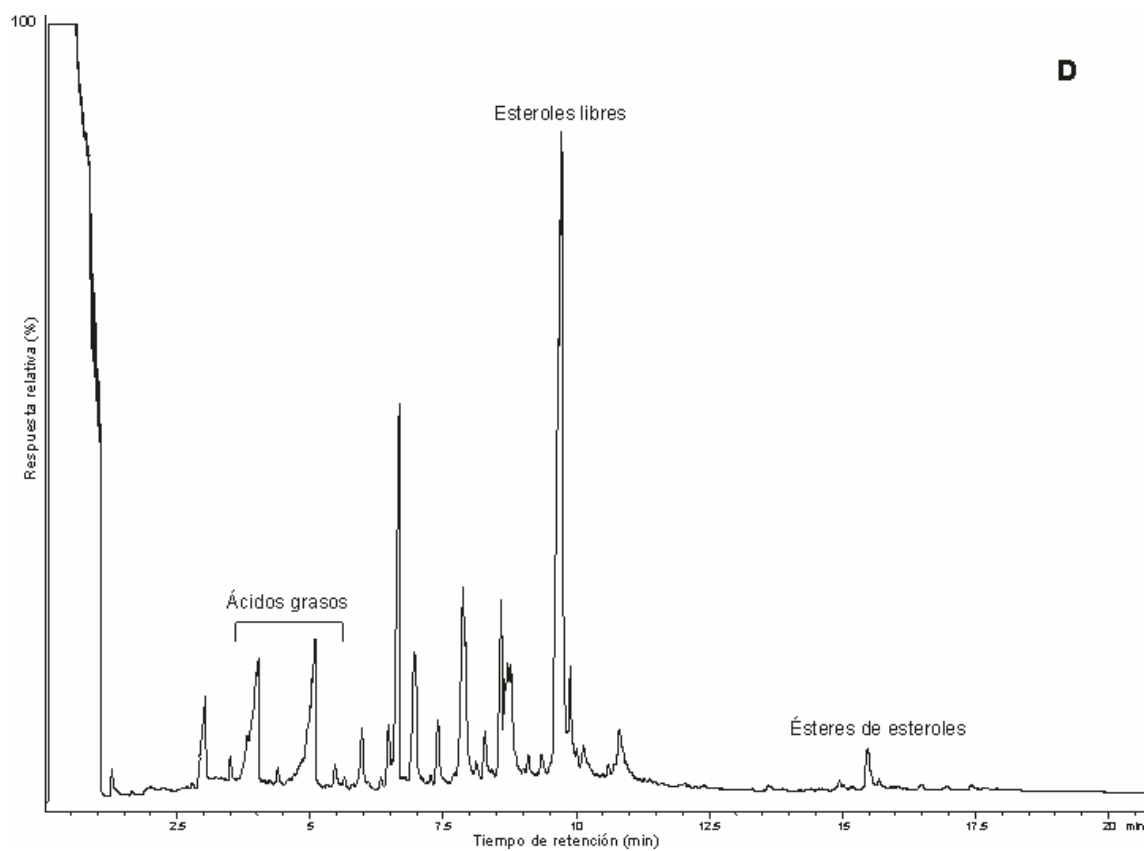
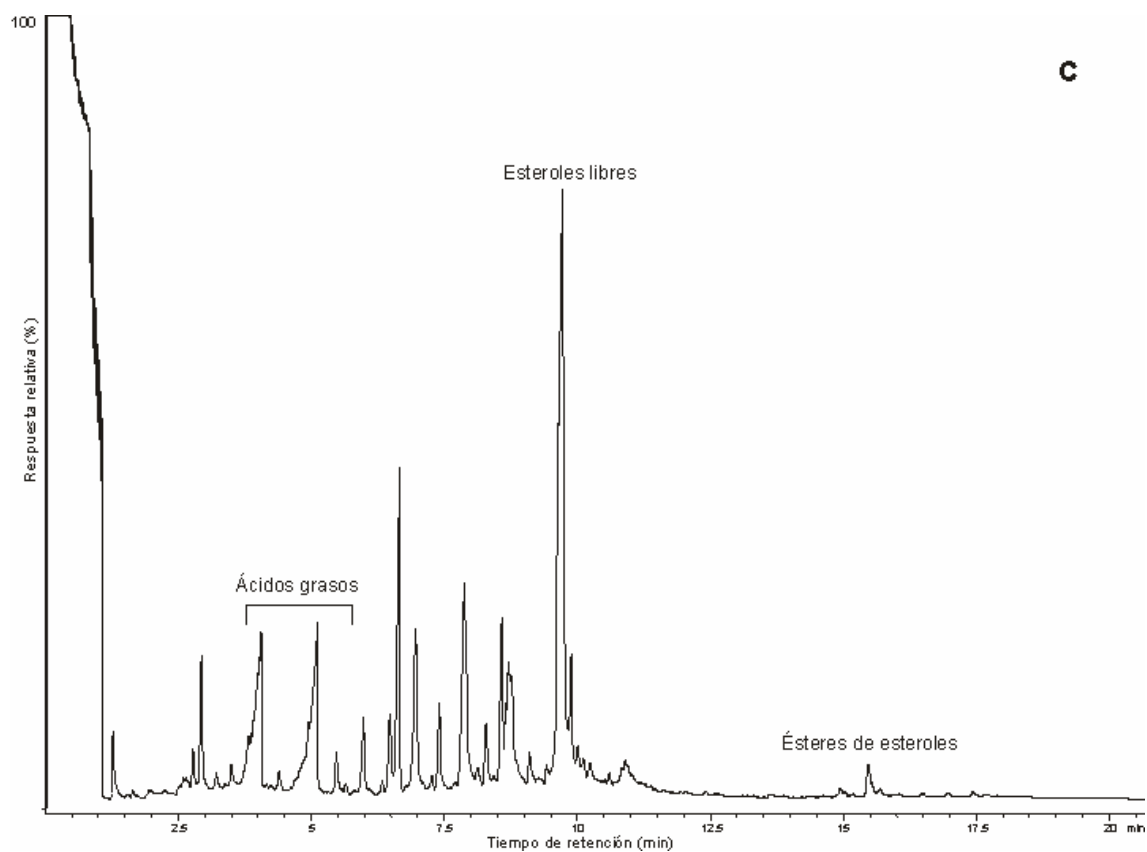
**Figura 6a:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* control **(A)** y tratada con lacasa de *P. cinnabarinus* sin mediador **(B)** antes de la fase de peróxido.



**Figura 6b:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* tratadas con con lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de metilsiringato **(C)** y siringaldehído **(D)** utilizados como mediadores naturales antes de la fase de peróxido.



**Figura 7a:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* control **(A)** y tratada con lacasa de *P. cinnabarinus* sin mediador **(B)** después de una fase de peróxido.



**Figura 7b:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* tratadas con con lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de metilsiringato **(C)** y siringaldehído **(D)** utilizados como mediadores naturales después de una fase de peróxido.

## 4.2 Tratamiento enzimático con lacasa de *M. thermophila*

Los análisis realizados mediante GC de las pastas tratadas con lacasa de *M. thermophila* y mediadores naturales evidencian la degradación de los extractos lipofílicos presentes en la pasta de *E. globulus* antes y después de la fase de blanqueo con peróxido (Figs 8 y 9 respectivamente).

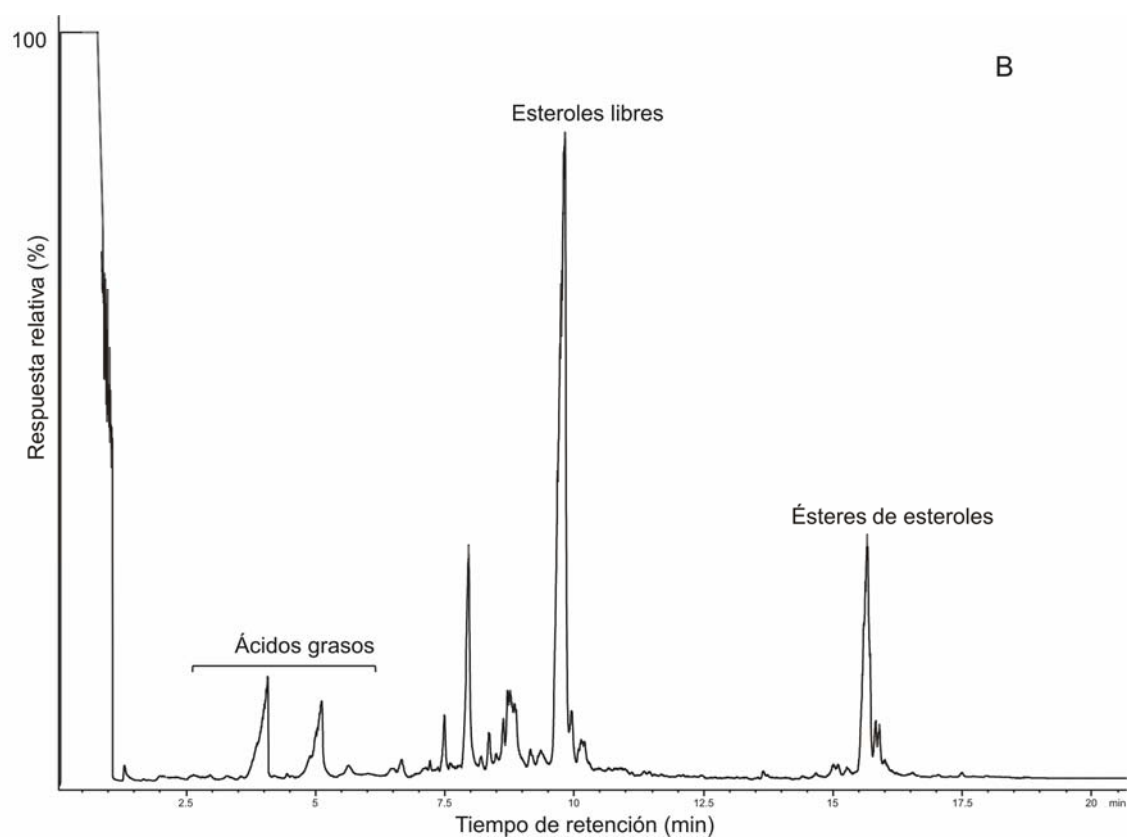
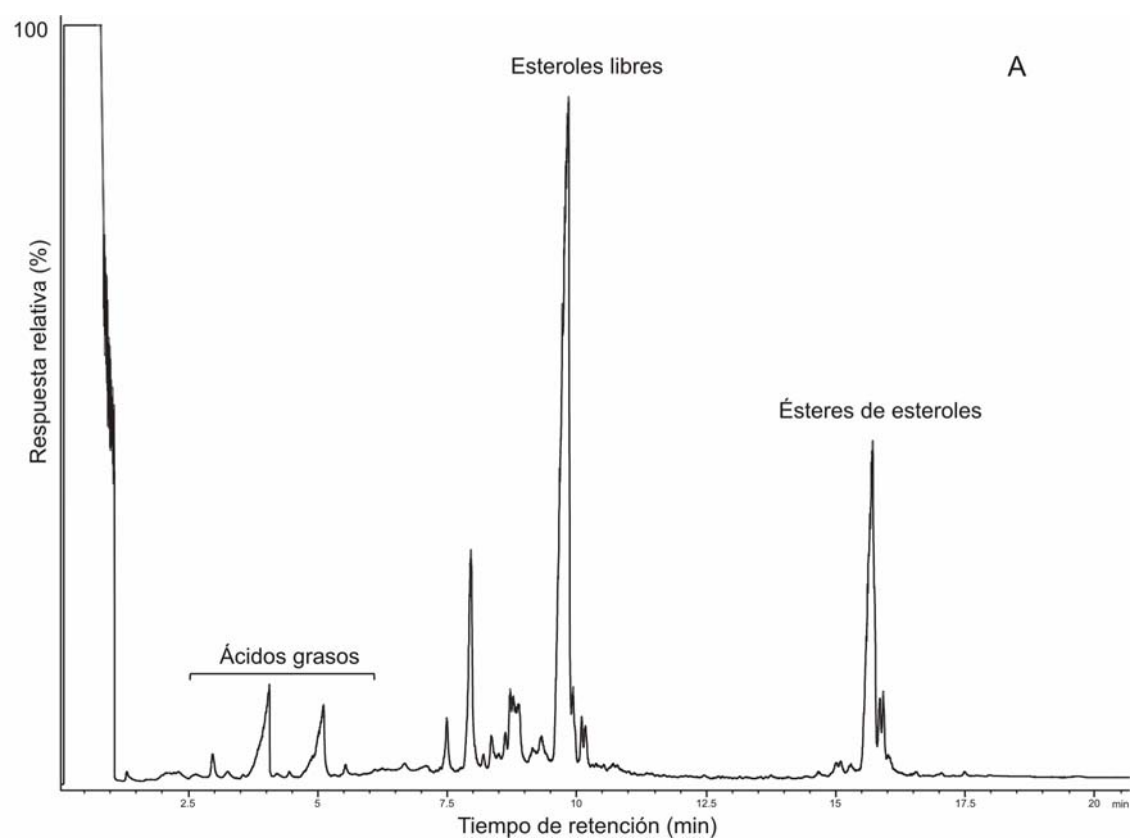
Como se puede observar en la tabla 3, los porcentajes de degradación para el tratamiento con lacasa sin mediadores, antes y después de la fase con peróxido, son los que consiguen menor degradación, eliminando aproximadamente un 10% los esteroides libres y un 40% los ésteres de esteroides. En el tratamiento de la pasta con lacasa de *M. thermophila* usando metilsiringato como mediador, sin y con peróxido, se obtiene una degradación del 15% para los esteroides libres y del 90% para los ésteres de esteroides.

Al tratar la pasta con lacasa de *M. thermophila* usando siringaldehído como mediador y aplicando una fase de peróxido posterior, se consigue la mayor degradación del extracto lipofílico de la pasta, 77% para los esteroides libres y 94% para los ésteres de esteroides. Estos resultados son similares a los publicados por Gutiérrez et al. (2009) donde se muestra que los esteroides libres fueron degradados en un 95-100% con el sistema lacasa de *P. cinnabarinus* - HBT, por lo cual el uso de estos mediadores naturales podría ser aplicado industrialmente ya que presentan un alto porcentaje de degradación de los extractivos lipofílicos y además presentan una gran ventaja frente a los mediadores sintéticos (HBT) por ser de bajo costo y toxicidad.

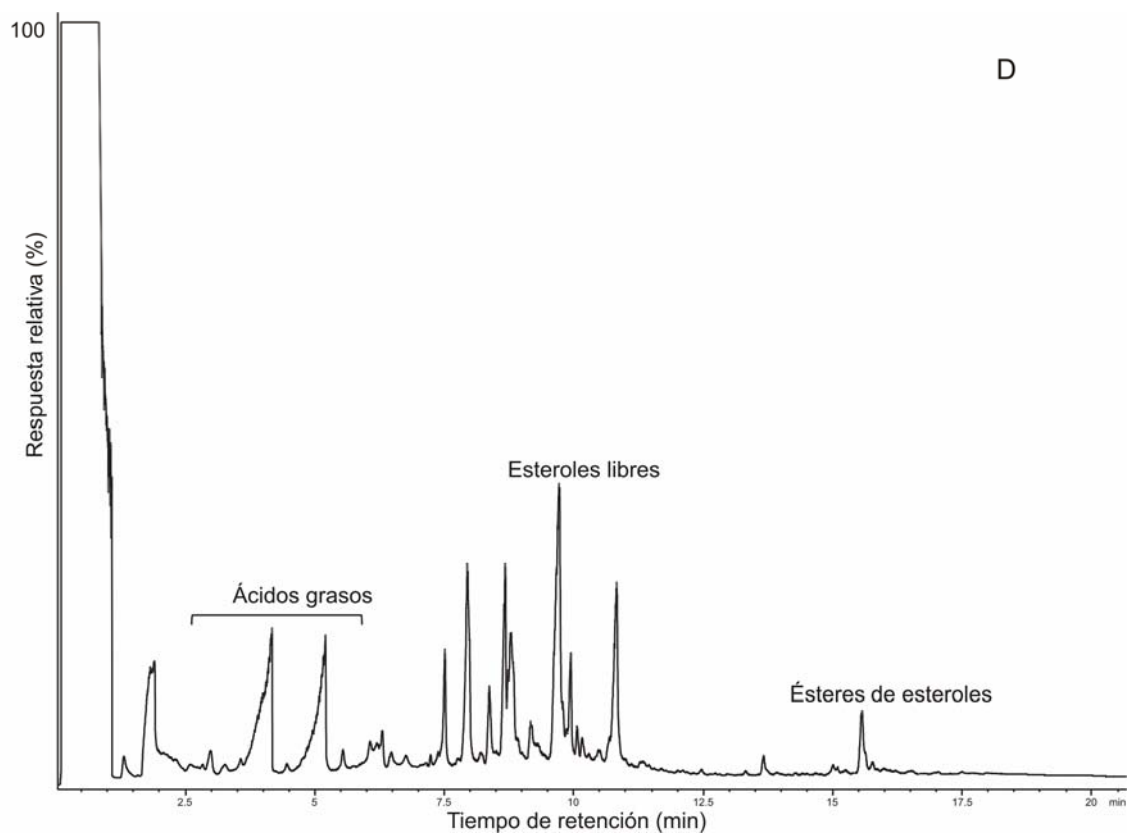
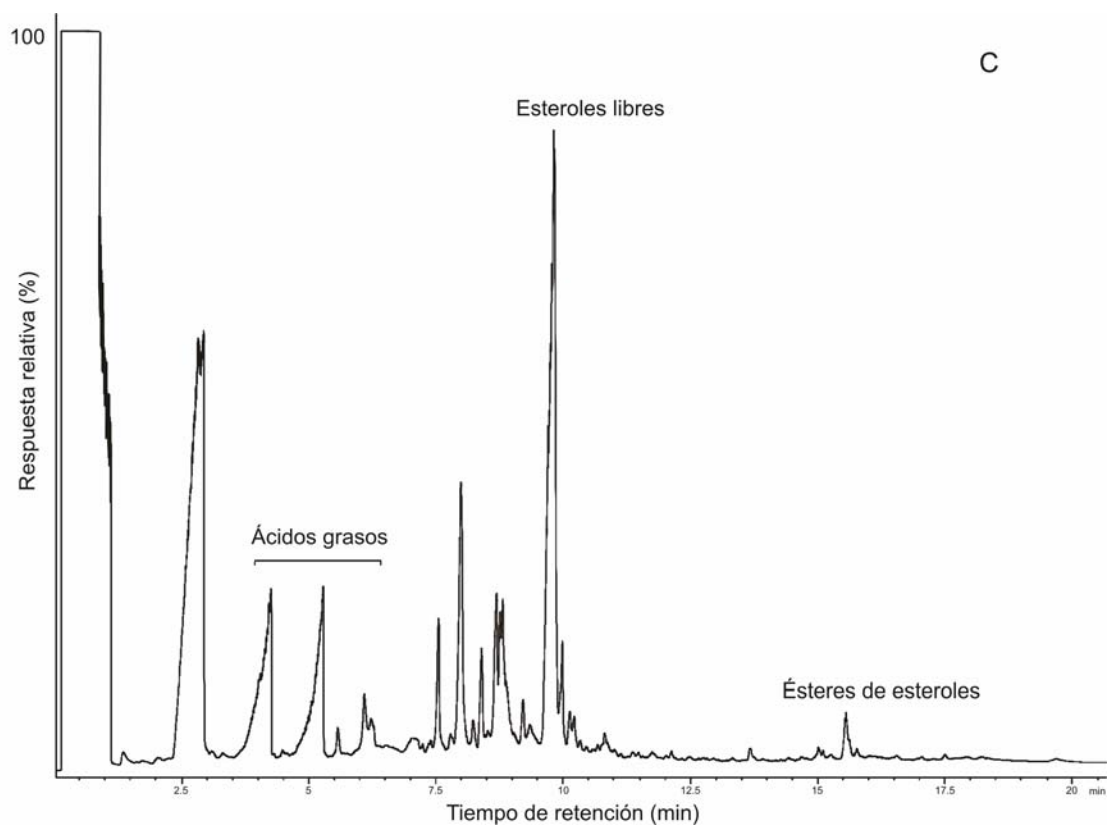
**Tabla 3:** Porcentajes de degradación de los principales grupos de lípidos de la pasta tratada con lacasa de *M. thermophila* en presencia de metilsiringato (MeS) y siringaldehído (Sir) como mediadores naturales antes y después de una fase de peróxido (P).

Degradación (%)			
	Lac Mt	Lac Mt-MeS	Lac Mt-Sir
Esteroides libres	14	16	67
Ésteres de esteroides	35	92	89
	Lac Mt-P	Lac Mt-MeS-P	Lac Mt-Sir-P
Esteroides libres	9	10	77
Ésteres de esteroides	41	84	94

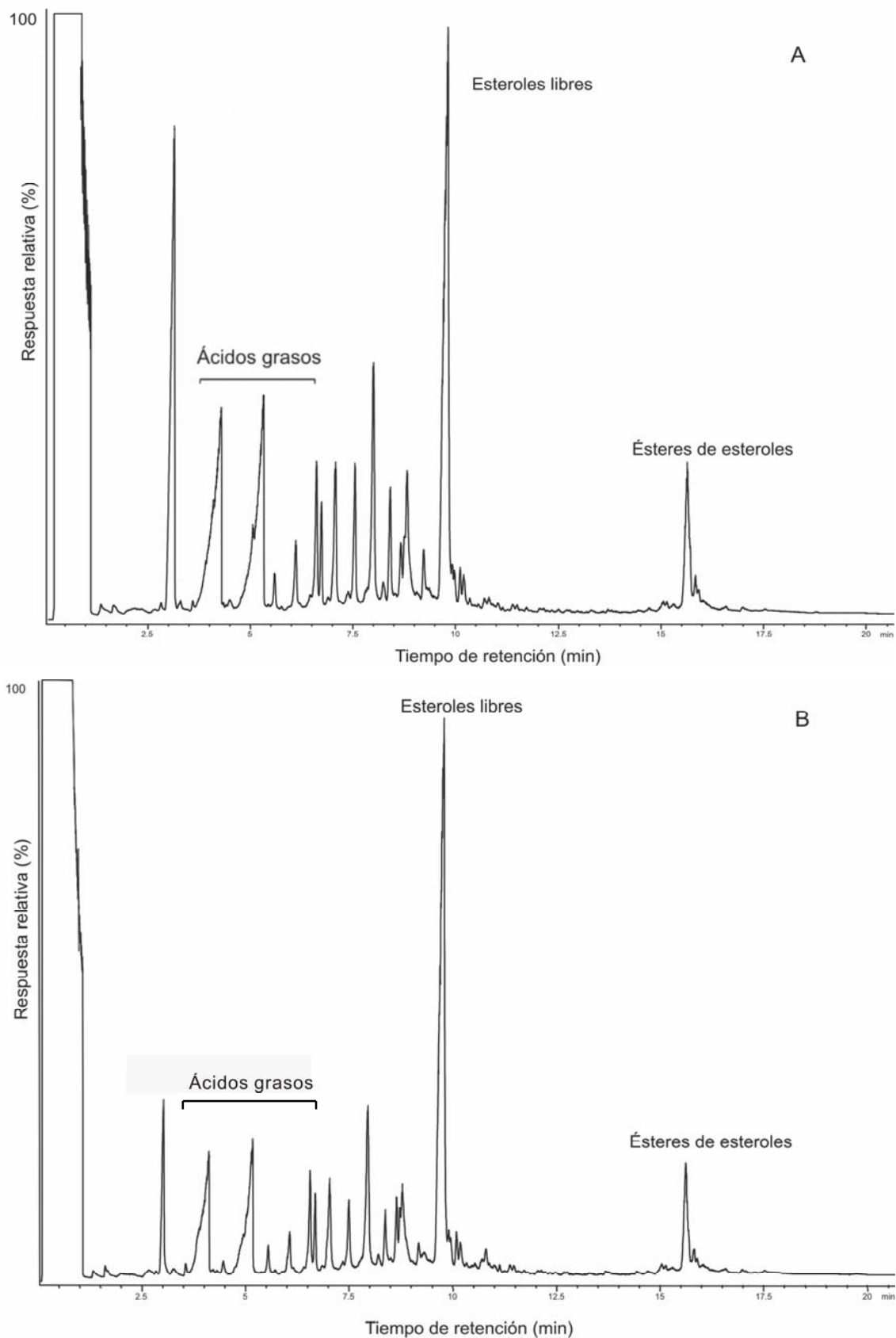




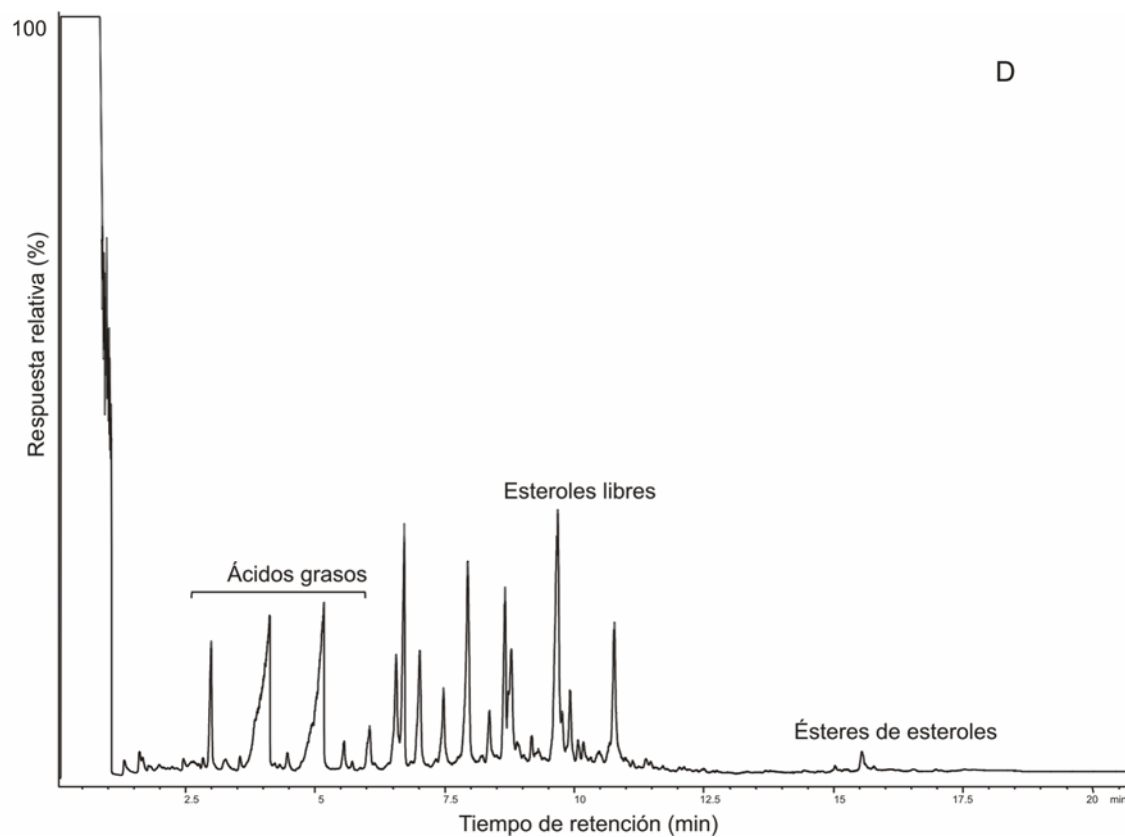
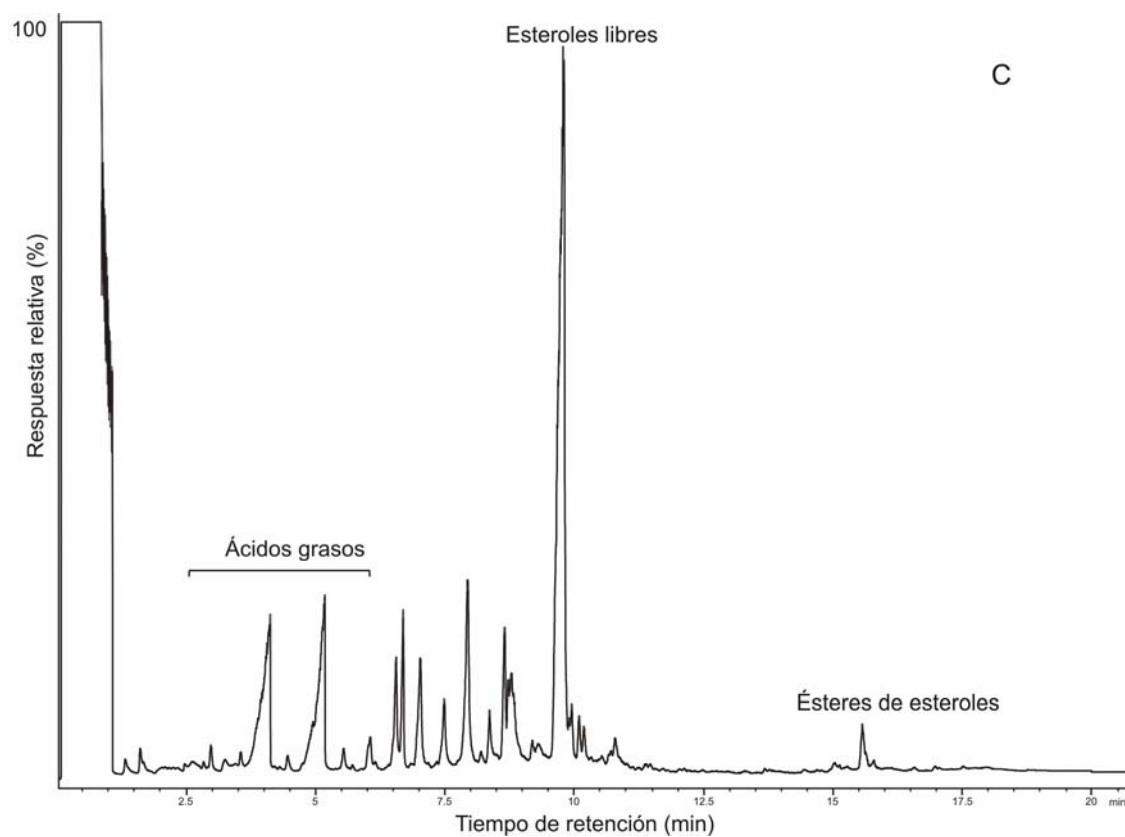
**Figura 8a:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* control **(A)** y tratada con lacasa de *M. thermophila* sin mediador **(B)** antes de la fase de peróxido.



**Figura 8b:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* tratadas con con lacasa de *M. thermophila* en presencia de metilsiringato **(C)** y siringaldehído **(D)** utilizados como mediadores naturales antes de la fase de peróxido.



**Figura 9a:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* control **(A)** y tratada con lacasa de *M. thermophila* sin mediador **(B)** después de una fase de peróxido.



**Figura 9b:** Cromatogramas de gases de los compuestos extraíbles lipofílicos de la pasta de *E. globulus* tratadas con con lacasa de *M. thermophila* en presencia de metilsiringato **(C)** y siringaldehído **(D)** utilizados como mediadores naturales después de una fase de peróxido.

En cuanto al blanqueo y deslignificación de las pastas, se puede afirmar que los tratamientos con la enzima lacasa de *M. thermophila* y los dos mediadores naturales sin fase de peróxido, no lo mejoran de forma apreciable, y que además disminuye la blancura % ISO, especialmente en los tratamientos con lacasa y siringaldehído como mediador (Tabla 4). En el tratamiento con la enzima lacasa y sin mediador disminuye tanto el índice Kappa en 0,4 puntos como la blancura % ISO en 2 puntos (Tabla 4).

Como se observa en la tabla 4, después de realizarle al tratamiento enzimático una fase de peróxido, los resultados de blancura % ISO y del índice Kappa mejoran dando los mejores resultados de blancura y deslignificación para el tratamiento con lacasa de *M. thermophila* y metilsiringato al igual que los resultados obtenidos para la lacasa de *P. cinnabarinus*, en el que el índice Kappa en este caso disminuye 2,7 puntos y la blancura % ISO aumenta 8,3 puntos. Estos resultados mejoran a los obtenidos con la lacasa de *Pycnoporus*. En los tratamientos con lacasa sin mediador y lacasa con mediador siringaldehído se disminuye el índice Kappa en 0,9 y 1,4 puntos respectivamente; la blancura % ISO aumenta en 3,1 y 4,7 puntos respectivamente.

**Tabla 4:** Propiedades de la pasta de *E. globulus* tras los tratamientos con lacasa de *M. thermophila* (Lac Mt) en presencia de los mediadores naturales metilsiringato (MeS) y siringaldehído (Sir) antes y después de una fase con peróxido (P).

Muestras	Blanqueo con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Índice Kappa	Blancura % ISO
<b>Control</b>	----	13,3	43,5
	<b>P</b>	<b>10,7</b>	<b>50,0</b>
<b>Lac Mt</b>	----	12,9	41,5
	<b>P</b>	<b>9,8</b>	<b>60,1</b>
<b>Lac Mt - MeS</b>	----	12,2	36,5
	<b>P</b>	<b>8,0</b>	<b>65,3</b>
<b>Lac Mt - Sir</b>	----	14,5	35,6
	<b>P</b>	<b>9,3</b>	<b>61,7</b>

## 5. CONCLUSIONES

- La lacasa de *P. cinnabarinus* en presencia de los mediadores naturales, metilsiringato y siringaldehído, es capaz de degradar los esteroides libres y los ésteres esteroides sin observarse diferencias significativas antes y después de realizar una fase de peróxido.
- La lacasa de *M. thermophila* en presencia de los mediadores naturales, metilsiringato y siringaldehído, es capaz de degradar los esteroides libres y los ésteres de esteroides obteniéndose los mejores resultados después de la fase de peróxido.
- En cuanto al blanqueo de la pasta, en los tratamientos realizados con lacasa de *M. thermophila* y metilsiringato se obtiene un aumento mayor de blancura (8 puntos) que el obtenido con lacasa de *P. cinnabarinus* y metilsiringato (5 puntos).
- El grado de deslignificación de la pasta es significativamente mayor en el tratamiento con lacasa de *M. thermophila* y metilsiringato descendiendo 2,7 puntos en el índice kappa que el obtenido con lacasa de *P. cinnabarinus* y metilsiringato que desciende en 1,1 puntos.
- En ambos tratamientos, tanto con lacasa de *M. thermophila* como *P. cinnabarinus*, los resultados obtenidos con metilsiringato como mediador fueron mejores que los obtenidos con siringaldehído y con las lacasas sin mediadores.
- A la vista de estos resultados, se puede decir que los mediadores ensayados son aptos para ser utilizados a nivel industrial, tanto como para la eliminación de los extractivos lipofílicos como para la deslignificación de la pasta.
- Con este sistema lacasa-mediador se pueden reducir los problemas de depósitos de pitch en la industria y aumentar la blancura de la pasta.

## 6. REFERENCIAS

- Adler E. 1977. Lignin Chemistry - Past, present and Future. Wood Sci. Technol. 11:169-218.
- Back EL, Allen LH. 2000. Pitch Control, Wood Resin and Deresination. Tappi Press, Atlanta, GA.
- Bidlack J, Malonge M, Benson R. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. Proceedings of the Oklahoma. Academy of Science. 72:51-56.
- Call HP. 1994. Verfahren zur Veränderung, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen. Patent WO 94/29510.
- Call HP, Mücke I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic system, especially laccase-mediator-system (Lignozyme(R)-process). J Biotechnol. 53:163-202.
- Camarero S, García O, Vidal T, Colom J, del Río JC, Gutiérrez A, Gras JM, Monje R, Martínez MJ, Martínez AT. 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. Enzyme microb Technol. 35:113-120.
- Gutiérrez A, del Río JC, Martínez MJ, Martínez AT. 2001. Biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends Biotechnol. 19:340-348.
- Gutiérrez A, del Río JC, Rencoret J, Ibarra D, Martínez AT. 2006a. Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:845-851.
- Gutiérrez A, del Río JC, Ibarra D, Rencoret J, Romero J, Speranza M, Camarero S, Martínez MJ, Martínez AT. 2006b. Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. Environ Sci Technol. 40:3416-3422.
- Gutiérrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, del Río JC, Martínez AT. 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. Environ Sci Technol. 41:4124-4129.

- Gutiérrez A, del Río JC, Rencoret J, Ibarra D, Speranza AM, Camarero S, Martínez MJ, Martínez AT. 2008. Mediator-enzyme system for controlling pitch deposits in pulp and paper production. US Patent 10080210393, European Patent EP 1 908 876 A1.
- Gutiérrez A, Del Río JC, Martínez AT. 2009. Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 82:1005-1018.
- Gutiérrez A, Del Río JC, Martínez AT. 2010. Fungi and their enzymes for pitch control in the pulp and paper industry. *Industrial Applications*, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag, Berlin. doi: 10.1016/j.biortech.2010.08.112
- Hillis WE, Sumimoto M. 1989. Effect of extractives on pulping. In: *Natural Products of Woody Plants II*; Ed. Rowe, JW Springer-Verlag, Berlin. 880-920.
- Ibarra D, Chávez MI, Rencoret J, del Río JC, Gutiérrez A, Romero J, Camarero S, Martínez MJ, Jiménez Barbero J, Martínez AT. 2007. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung*. 61:643-646.
- Leach JM, Thakore AN. 1976. Toxic constituents in mechanical pulping effluents. *TAPPI*. 59:129-132.
- Liss SN, Bicho PA, Saddler JN. 1997. Microbiology and biodegradation of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (peritan Na). *Phytochemistry* 24(3):393-396.
- Mayer AM, Staples RC. 2002. Laccase: New functions for an old enzymes. *Phytochemistry*. 60(6):551-565.
- Molina S, Rencoret J, del Río JC, Lomascolo A, Record E, Martínez AT, Gutiérrez A. 2008. Oxidative degradation of model lipids representative for main paper pulp lipophilic extractives by the laccase-mediator system. 80:211-222.
- Morozova OV, Shumakovich GP, Shleev SV, Yaropolov YI. 2007. Laccase-mediator system and their applications: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43:523-535.



- Pice MG, Bourbonnais R. Reid ID, Archibald FS, Jurasek L. 1995. Oxidative bleaching enzymes: a review. *Journal of pulp and paper science*. 21(8):J280-J284.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzyme for green chemistry. *Trends Biotechnol*. 24:165-174.
- Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv*. 24:500-513.
- Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Pérez-Boada M, Martínez MJ, Sigoillot JC, Asther M, Colom J, Martínez AT. 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J Biotechnol*. 115:333-343.
- Streitwieser A. Jr. y Heathcok CH. 1983. *Química Orgánica*, 3º edición. Importecnia S.A. 726-730.
- Widsten P, Kandelbauer A. 2008. Laccase application in the forest processing industries: a review. *Enzyme microb Technol*. 42:293-307.